

氏 名	兒玉 真一
学 位	博士
専門分野の名称	歯学
学位授与番号	博甲第4724号
学位授与の日付	平成25年3月25日
学位授与の要件	医歯薬学総合研究科病態制御科学専攻 (学位規則(文部省令)第4条第1項該当)
学位論文題目	ニコチンが口腔癌の増殖およびリンパ節転移に与える影響に関する研究
学位論文審査委員	長塚 仁 教授 飯田 征二 教授 佐々木 朗 教授

学位論文内容の要旨

【緒言】

喫煙は発癌や癌の進行に関連する。特に、口腔はタバコ煙に直接的に曝露する臓器である。タバコ煙の粒子相はタールとニコチンを含む。タールは発癌性物質を多く含有するが、ニコチンは発癌性物質ではなく依存症に関与する。ニコチンは、大部分が肺胞から吸収され、残りは口腔などの粘膜から吸収される。ニコチンはニコチン性アセチルコリン受容体(nAChR)に結合する。nAChRは $\alpha 1-10$, $\beta 1-4$, γ , δ , ϵ のサブユニットから構成され、中枢神経系や神経筋接合部に存在する。ニコチンが中脳の腹側被蓋野に存在するnAChRに結合すると、視床下部にある側坐核に過剰のドーパミンが放出され、前頭葉へ投射されることにより、多幸感や覚醒作用をもたらす。これが繰り返されニコチン依存症が獲得される。

nAChRは主に神経系に局在すると考えられていたが、最近の研究で非神経系細胞にも広く存在することが明らかにされた。また肺癌、乳癌、膵癌、大腸癌でも発現を認め、腫瘍増殖の促進に関与することが報告された。しかし、口腔癌細胞におけるニコチンの役割については分かっていない。そこで本研究では、ニコチン-nAChR系が口腔癌細胞の増殖・転移に与える影響について検討を行った。

【材料および方法】

1) ニコチンがリンパ節転移モデルに与える影響

5週齢雄ヌードマウスの足底皮下に、転移形成能を有するヒト口腔扁平上皮癌細胞のOSC-19細胞(ヒューマンサイエンス研究資源バンクより供与)を移植するリンパ節転移動物モデルを作製した。ニコチン(1.5mg/kg)を隔日で腹腔内注射し腫瘍体積を経時的に計測した。移植6週間後にマウスを屠殺し原発巣と膝下リンパ節を摘出し、組織学的に転移の有無を検討した。原発巣におけるリンパ管新生は、抗マウスLYVE1ウサギポリクローナル抗体を用い免疫組織化学染色を行い評価した。

2) ニコチンが口腔癌細胞に与える影響

In vitroではヒト口腔扁平上皮癌細胞のHSC-2, HSC-3, OSC-19, OSC-20細胞の培養液中にニコチン(0.5 μ M)を添加し、増殖能を検討した。またOSC-19細胞にニコチン(0.5 μ M)を添加し、wound healing assayで運動能, migration assayで遊走能, invasion assayで浸潤能を評価した。

3) ニコチンが口腔癌細胞のnAChRと細胞内シグナル伝達に与える影響

ニコチンがOSC-19細胞のnAChRに与える影響は、正常の口腔上皮細胞で発現が認められている $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\alpha 7$, $\alpha 9$, $\beta 2$, $\beta 4$ のサブユニットについて、定量的リアルタイムRT-PCRで評価した。細胞内シグナル伝達経路は、nAChR非選択的阻害薬のメカミラミン塩酸塩と $\alpha 7$ 選択的阻害薬の α -ブンガロトキシンを用い、ウエスタンブロット法で検討した。

【結果】

1) リンパ節転移動物モデルにおいて、ニコチンが腫瘍増殖とリンパ節転移に与える影響を検討した。移植6週間後に腫瘍体積は、ニコチン投与群 $298.3 \pm 66.4 \text{ mm}^3$ 、対照群 $181.4 \pm 69.7 \text{ mm}^3$ となり、ニコチン投与群が対照群と比べて有意に腫瘍体積が増加した。またリンパ節転移はニコチン投与群が39%、対照群13%に認め、ニコチン投与群が対照群と比べて有意にリンパ節転移を認めた。免疫組織化学染色では対照群とニコチン投与群における原発巣のリンパ管数は変化を認めず、ニコチン投与でリンパ管新生は促進されていないと考えられた。

2) HSC-2, HSC-3, OSC-19, OSC-20細胞の培養液にニコチンを添加すると、経時的に細胞増殖し、ニコチン添加群が対照群と比べて有意に増殖能を促進した。またOSC-19細胞で運動能、遊走能、浸潤能を検討したところ、ニコチン添加群が対照群と比べて有意に運動能、遊走能、浸潤能を促進した。

3) ニコチンがOSC-19細胞のnAChRに与える影響について検討したところ、ニコチン添加により $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\alpha 7$, $\beta 2$, $\beta 4$ のサブユニットにおいて発現増加を認めた。 $\alpha 9$ のサブユニットについては増加傾向を示したが、有意差は認めなかった。またシグナル伝達因子であるERK1/2, Aktはニコチン添加によりリン酸化を認めた。ERKは経時的に活性化が上昇し、ニコチン添加30分後に最大となった。メカミラミン塩酸塩と α -ブングアロトキシンの添加によりAktのリン酸化が抑制されたが、ERK1/2のリン酸化は変化を認めなかった。

【考察】

リンパ節転移動物モデルにおいて、ニコチン投与群は対照群と比較して腫瘍体積が増大しリンパ節転移は促進されていた。腫瘍体積の増加は、肺癌細胞を用いた動物モデルにおいても報告されている。また本研究のin vitroの実験系において、ニコチン添加群は対照群と比較して細胞増殖が促進されていた。以上からニコチンが口腔癌細胞の増殖を促進していると考えられた。

動物モデルにおいて、リンパ節転移が促進されていたが、ニコチン投与群の原発巣においてリンパ管新生は促進されておらず、リンパ管新生以外に起因すると考えられた。OSC-19細胞の運動能、遊走能、浸潤能について、いずれもニコチン添加群が対照群より促進されていたことから、リンパ節転移の促進については、ニコチンによるリンパ管新生ではなく、癌細胞の運動能、遊走能、浸潤能の亢進が関与すると考えられた。

ニコチン添加によりOSC-19細胞のnAChR発現が上昇した。nAChRの発現変化については肺癌細胞では発現増加を、乳癌細胞では発現の変化を認めず、細胞種により異なるようである。またニコチン添加により、シグナル伝達因子ERK1/2とAktのリン酸化を認めた。メカミラミン塩酸塩と α -ブングアロトキシンの添加によってもERK1/2のリン酸化は変化を認めず、上記のnAChR阻害薬では阻害できないサブユニットの存在を推測させた。Aktのリン酸化については、メカミラミン塩酸塩と α -ブングアロトキシンの添加により抑制され、少なくともAktの活性化に $\alpha 7$ が関与していると考えられた。

以上のことから、ニコチンは口腔癌細胞においてnAChRの発現を増加させ、シグナル伝達因子ERK1/2およびAktを活性化し腫瘍増殖とリンパ節転移を促進している可能性があると考えられた。

学位論文審査結果の要旨

【緒言】タバコ煙に含まれるニコチンは、大部分が肺胞から吸収され、残りは口腔などの粘膜から吸収される。ニコチンはニコチン性アセチルコリン受容体 (nAChR) に結合する。nAChRは $\alpha 1-10$, $\beta 1-4$, γ , δ , ϵ のサブユニットからなり中枢神経系に存在し依存症に関与する。nAChRは神経系のみならず、最近の研究ではnAChRは非神経系細胞にも存在することが明らかとなった。またnAChRは肺癌、乳癌、膀胱癌、大腸癌で発現を認め、ニコチンが腫瘍増殖の促進に関与することが報告された。しかし、口腔癌におけるニコチンの役割は不明である。本研究はニコチン-nAChR系が口腔癌の増殖・転移に与える影響を検討した。

【材料および方法】ヌードマウスの足底皮下にヒト口腔扁平上皮癌細胞を移植するリンパ節転移動物モデルを作製した。ニコチンを隔日で腹腔内注射し腫瘍体積を経時的に計測した。移植6週間後にマウスを屠殺し移植部と膝下リンパ節を組織学的に検討した。リンパ管新生は、抗マウスLYVE1抗体を用い免疫組織化学染色を行い評価した。In vitroではヒト口腔扁平上皮癌細胞の培養液中にニコチンを添加し増殖能 (cell count), 運動能 (wound healing assay), 遊走能 (migration assay), 浸潤能 (invasion assay) を評価した。nAChR発現は定量的リアルタイムRT-PCRで、細胞内シグナル伝達経路は、nAChRの非選択的阻害薬であるメカミラミンと $\alpha 7$ 選択的阻害薬の α ブンガロトキシシンを用い、ウエスタンブロット法で検討した。

【結果】リンパ節転移動物モデルにおいて、ニコチン投与群では腫瘍体積が増加し、リンパ節転移が促進された。対照群とニコチン投与群における癌移植部のリンパ管数は差を認めなかった。ヒト口腔扁平上皮癌細胞の培養液にニコチンを添加すると、増殖能、運動能、遊走能、浸潤能が促進された。nAChRの発現については、ニコチン添加により $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\alpha 7$, $\beta 2$, $\beta 4$ の発現増加を認めた。シグナル伝達因子ERK1/2, Aktはニコチン添加によりリン酸化を認めた。メカミラミンと α ブンガロトキシシンの添加によりAktのリン酸化が抑制されたが、ERK1/2のリン酸化は変化を認めなかった。

【考察】リンパ節転移動物モデルにおいて、ニコチンは腫瘍を増大させ、リンパ節転移は促進した。in vitroの実験系も、ニコチン添加群は細胞増殖を促進した。動物モデルでリンパ節転移が促進されていたが、ニコチン投与群では移植部でのリンパ管新生は促進されておらず、リンパ管新生以外の要因に起因すると考えられた。ヒト口腔扁平上皮癌細胞の運動能、遊走能、浸潤能について、いずれもニコチン添加群が対照群より促進していたことから、リンパ節転移の促進はこれらの要因によると考えられた。またニコチン添加によりヒト口腔扁平上皮癌細胞のnAChR発現が上昇し、ERK1/2とAktのリン酸化を認めた。メカミラミンの添加によってもERK1/2のリン酸化は変化をしなかった。メカミラミンはnAChRを非選択的に阻害するが、サブユニット間において拮抗作用の違いがあり、それに起因すると推察された。Aktのリン酸化は、メカミラミンと α ブンガロトキシシンの添加により抑制され、少なくともAktの活性化に $\alpha 7$ が関与していると考えられた。以上のことから、ニコチンはヒト口腔扁平上皮癌細胞においてnAChRの発現を増加させ、ERK1/2およびAktを活性化し腫瘍増殖とリンパ節転移を促進していると推察された。

本論文は、ニコチンに口腔癌の増殖およびリンパ節転移を促進する作用があることを示す重要な知見である。よって論文審査担当者は一致して、本論文に博士(歯学)の学位論文としての価値を認める。